

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2001年1月18日 (18.01.2001)

PCT

(10)国際公開番号
WO 01/04312 A1

(51)国際特許分類: C12N 15/16, 15/12, 15/85, 5/10, C12P 21/02, C07K 14/575, 14/72, C12Q 1/68, 1/02, A61K 67/027 // (C12P 21/02, C12R 1:91)

(21)国際出願番号: PCT/JP00/04514

(22)国際出願日: 2000年7月6日 (06.07.2000)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:
特願平11/194179 1999年7月8日 (08.07.1999) JP
60/159,586 1999年10月18日 (18.10.1999) US(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社
ヘリックス研究所 (HELIX RESEARCH INSTITUTE)
[JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532番地3
Chiba (JP).(72)発明者; および
(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 田代紀夫 (OTA, Toshio) [JP/JP]; 〒251-0042 神奈川県藤沢市辻堂新町1-2-7-105 Kanagawa (JP). 磯貝隆夫 (ISOGAI, Takao) [JP/JP]; 〒300-0303 茨城県稻敷郡阿見町大室511-12 Ibaraki (JP). 西川哲夫 (NISHIKAWA, Tetsuo) [JP/JP]; 〒173-0013 東京都板橋区氷川町27-3-403 Tokyo (JP).

河合弓利 (KAWAI, Yurii) [JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那4508-19-201 Chiba (JP). 吉田賢二 (YOSHIDA, Kenji) [JP/JP]; 〒292-0043 千葉県木更津市東太田4-11-1-302 Chiba (JP). 増保安彦 (MASUHO, Yasuhiko) [JP/JP]; 〒184-0011 東京都小金井市東町5-19-15 Tokyo (JP).

(74)代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsuhi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84)指定国(広域): ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

[締葉有]

(54) Title: PROLIFERATION DIFFERENTIATION FACTOR

(54)発明の名称: 増殖分化因子

(57)Abstract: A protein encoded by PSEC137 cloned from a full-length human cDNA library. This protein is a novel protein having a thorombopoietin (TPO)/erythropoietin (EPO)-like amino acid sequence. This protein is expected as a novel hematopoietic factor inducing the differentiation of hemic precursor cells, etc.

(57)要約:

WO 01/04312 A1

全長ヒトcDNAライブラリーからクローニングされたPSEC137がコードする蛋白質が提供された。この蛋白質は、トロンボポエチン(thrombopoietin; TPO)・エリスロポエチン(erythropoietin; EPO)様のアミノ酸配列を持つ、新規な蛋白質である。本発明の蛋白質は、血液系前駆細胞の分化等を誘導する新たな造血因子として期待できる。



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

増殖分化因子

技術分野

本発明は、増殖分化因子をコードする遺伝子に関する。

背景技術

血液細胞の形成は、少数の造血幹細胞が特定細胞系列の前駆細胞を生じ、その後増殖と分化を経て成熟した血液細胞を生成する過程よりなる。この過程は特異的に作用する複数のホルモンの働きによって制御されており、これらホルモンは増殖分化因子・コロニー刺激因子と総称される (Dexter (1989) Br. Med. Bull. 45, 337 ; Ogawa (1989) Environ. Health Persp. 80, 199 ; Metcalf (1985) Science 229, 16 ; Golde and Gasson (1988) Scientific American July, 62)。

増殖分化因子は、様々な細胞に対して、増殖や分化のシグナルを伝える液性因子である。たとえばエリスロポエチン(erythropoietin; EPO)は、赤血球系の前駆細胞の増殖と分化を促進する因子として単離された。EPOは、後に造血因子として貧血の治療に利用されることになる重要な増殖分化因子である。

EPOが赤血球系前駆細胞に作用するのに対して、巨核球系細胞の増殖を促す因子の存在が予測されていた。そして c-mpl リガンドとして単離された遺伝子によってコードされる蛋白質に巨核球細胞の増殖作用が見出された。c-mpl リガンドは、巨核球細胞増殖因子であることが明らかになり、トロンボポエチン(thrombopoietin; TPO)と同定された(Lok et al. (1994) Nature 369, 568; Bartley et al. (1994) Cell 77, 1117; de Sauvage et al. (1994) Nature 369, 533)。巨核球系細胞は、血小板の形成などに関わる細胞である。TPOによって、抗がん剤

投与の副作用による血小板減少症等の治療が可能になるのではないかと期待されている。

ヒトTPOはそのN末端部分(アミノ酸残基1-172)がヒトEPOに対し、23%の配列相同意を示し(Gurney et al. (1995) *Blood* 85, 981-988; Bartley et al. (1994) *Cell* 77, 1117-1124; de Sauvage et al. (1994) *Nature* 369, 533)、増殖分化因子群の中でファミリーを形成する。しかし、その後、この種のEPO/TPOファミリーに属する増殖分化因子についての報告は少ない。新たな増殖分化因子は、その増殖分化誘導活性の大きさや、作用する細胞のスペクトル等の点で、既知の因子とは異なっている可能性がある。そのため、新たな因子の単離が望まれている。

発明の開示

本発明は、増殖分化因子とそれをコードする遺伝子、並びにそれらの製造方法及び用途を提供することを課題とする。新規な増殖分化因子、あるいはその活性や発現を修飾する化合物は、血液細胞の異常に伴う疾患の治療薬として期待される。

そこで本発明者らは、上記の課題を解決するために、新規なヒト遺伝子のクローニングを目的として、下記の如く鋭意研究を行った。まず、オリゴキャップ法(Maruyama K. and Sugano S. *Gene* 138: 171-174, 1994; Suzuki Y. et al. *Gene* 200: 149-156, 1997)で作製した全長率の高いヒトcDNAライブラリーを構成するクローンを単離した。次いで、この方法で取得した全長率の高いcDNAクローンの塩基配列を5'側と3'側の両側から決定した。そして、ATGpr(Salamov A. A. et al. *Bioinformatics* 14: 384-390, 1998; <http://www.hri.co.jp/atgpr/>)等で全長cDNAクローンであると予想されるヒト全長cDNAを選択した。こうして得られたヒト全長cDNAクローンの塩基配列を利用し、PSORT(Nakai K and Kanehisa M. *Genomics* 14: 897-911, 1992)でシグナル配列を持つと予想されるクローン

を特異的に選別し、分泌蛋白質をコードする cDNA を有すると予想されるクローニングを取得した。該クローニングの全長 cDNA 配列を解析し、その塩基配列がコードするアミノ酸配列を推定した。そして推定アミノ酸配列に基づいて、BLAST(Altschul S. F. et al. J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990; Gish W. and States D. J. Nature Genet. 3: 266-272, 1993; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)により、GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Genbank/index.html>)や SwissProt(http://www.ebi.ac.uk/ebi_docs/swissprot_db/swisshome.html)を利用して相同性解析を行った。

こうした解析を通じて、本発明者らは全長 cDNA クローニングの 1 つである PSEC0137 (以下、PSEC137 と記載する) に注目した。PSEC137 蛋白質 N 末端 213 残基は、TPO における TPO 活性断片を含む N 末端 215 残基に対し 23.9% の同一性を示し、EPO193 残基に対しては、23.1% の同一性を示した (図 1)。蛋白質非重複データベースに対する BLAST 検索により、megakaryocyte stimulating factor (Genbank Accession, U70136)との相同性が示された (図 2)。C 末端領域では、PFAM thrombospondin type 1 domain が同定された (図 3)。PSEC137 蛋白質配列上には既存の蛋白質モティーフに属さない繰り返し配列が存在し (アミノ酸残基番号 47-127 と 128-208)、その配列は 84% 同一である。その他には構造的な共通性を持つ蛋白質は見出しができず、PSEC137 が新規な蛋白質であることが示された。

これらの事実に基づき、本発明者らは、PSEC137 によってコードされる蛋白質が、新規な TPO/EPO 様分子であることを見出し本発明を完成させた。すなわち本発明は、以下の新規な分泌蛋白質、およびその遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関する。

(1) 下記 (a) から (f) のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

(a) 配列番号：1 に記載された塩基配列の蛋白質コード領域を含むポリヌクレオチド。

(b) 配列番号：2に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(c) 配列番号：2に記載に記載されたアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号：2に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(d) 配列番号：1に記載された塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、配列番号：2に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(e) 配列番号：2に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド。

(f) 配列番号：2に記載に記載されたアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号：2に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド。

(2) (1)に記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質またはその部分ペプチド。

(3) 配列番号：2におけるN末端側の27から213アミノ酸残基から選択されるアミノ酸配列を含む、(2)に記載の部分ペプチド。

(4) (1)に記載のポリヌクレオチドが挿入されたベクター。

(5) (1)に記載のポリヌクレオチド、または(4)に記載のベクターを保持する形質転換体。

(6) (5)に記載の形質転換体を培養し、発現産物を回収する工程を含む、

(2)に記載の蛋白質またはその部分ペプチドの製造方法。

(7) (1) に記載のポリヌクレオチドのいずれか、またはその相補鎖にハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を持つポリヌクレオチド。

(8) (7) に記載のポリヌクレオチドからなる、(1) に記載のポリヌクレオチド合成用プライマー。

(9) (7) に記載のポリヌクレオチドからなる、(1) に記載のポリヌクレオチドの検出用プローブ。

(10) (1) に記載のポリヌクレオチドもしくはその一部に対するアンチセンス DNA。

(11) (2) に記載の蛋白質の受容体をコードする遺伝子を単離する方法であって、

(a) 遺伝子のライブラリーを発現する細胞に (2) に記載の蛋白質を接触させる工程、および

(b) (2) に記載の蛋白質と結合することができるクローンを選択する工程、

を含む方法。

(12) (11) に記載の方法によって単離されうる (2) に記載の蛋白質の受容体をコードする遺伝子。

(13) (12) に記載の遺伝子によってコードされる (2) に記載の蛋白質の受容体。

(14) (2) に記載の蛋白質とその受容体との結合に干渉する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) (2) に記載の蛋白質の受容体を発現する細胞と (2) に記載の蛋白質とを、候補化合物の存在下で、または前記細胞と候補化合物を接触させた後に接触させる工程、および

(b) (2) に記載の蛋白質の結合量に干渉する化合物を選択する工程、を含む方法。

(15) (14) に記載の方法により単離されうる、(2) に記載の蛋白質とその受容体との結合に干渉する化合物。

(16) (2) に記載の蛋白質の発現が改変されるように操作された非ヒト脊椎動物。

(17) ノックアウト動物またはトランスジェニック動物である、(16) に記載の非ヒト脊椎動物。

(18) マウスである、(17) に記載の非ヒト脊椎動物。

本発明におけるアミノ酸配列や塩基配列の相同性は、Karlin and Altschul によるアルゴリズム BLAST (Proc. Natl. Acad. Sei. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、NBLAST や XBLAST と呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:40 3-410, 1990)。BLAST に基づいて NBLAST によって塩基配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 100、wordlength = 12 とする。また、BLAST に基づいて XBLAST によってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 50、wordlength = 3 とする。BLAST と Gapped BLAST プログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.>)。

本発明は、新規な分泌蛋白質 PSEC137 に関する。本発明の蛋白質に含まれる P SEC137 (配列番号 : 2) は、ヒト胎盤組織から調製された cDNA をスクリーニングすることにより得られた遺伝子がコードする分泌蛋白質である。この蛋白質は、EPO や TPO の相同領域に類似した構造を持つ新規な増殖分化因子である。従って、本発明の蛋白質やその遺伝子、また、本発明の遺伝子の発現や蛋白質の活性を調節する化合物は、血液細胞の異常によってもたらされる疾患の予防や治療への応

用が考えられる。また、本発明の遺伝子や蛋白質の構造や発現レベルの異常を検出することにより、疾患の原因を明らかにすることもできる。

本発明の蛋白質は、組み換え蛋白質として、また天然の蛋白質として調製することが可能である。組み換え蛋白質は、例えば、後述するように本発明の蛋白質をコードするDNAを挿入したベクターを適当な宿主細胞に導入し、形質転換体内で発現した蛋白質を精製することにより調製することが可能である。

一方、天然の蛋白質は、例えば、後述する本発明の蛋白質に対する抗体を結合したアフィニティカラムを利用して調製することができる(*Current Protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons Section 16.1-16.19)。アフィニティー精製に用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。また、インビトロトランスレーション(例えば、「On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system. Dasso, M.C., Jackson, R.J. (1989) NAR 17:3129-3144」参照)などにより本発明の蛋白質を調製することも可能である。

本発明には、配列番号：2に示すアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質が含まれる。「配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等」とは、対象となる蛋白質がPSEC137蛋白質と同等の生物学的特性を有していることを意味する。PSEC137蛋白質が持つ生物学的特性としては、血液系前駆細胞に作用し増殖分化を促進する活性を挙げることができる。本発明の蛋白質が有する増殖分化促進作用の少なくとも一部の同等の活性を有する蛋白質は、機能的に同等であると言うことができる。

本発明においてPSEC137と機能的に同等な蛋白質は、配列番号：2に示すアミノ酸配列に対して、少なくとも85%以上のアミノ酸の同一性を示すことが望ま

しい。本発明における機能的に同等な蛋白質は、具体的には90%以上、より望ましくは95%以上のアミノ酸配列の同一性を示す。アミノ酸配列の同一性は、BLAST検索アルゴリズムなどによって決定することができる。

蛋白質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内である。

PSEC137と機能的に同等な蛋白質は、当業者であれば、例えば、蛋白質中のアミノ酸配列に変異を導入する方法（例えば、部位特異的変異誘発法（Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al., 1987: Publish. John Wiley and Sons Section 8.1-8.5）を利用して調製することができる。また、このような蛋白質は、自然界におけるアミノ酸の変異により生じることもある。

その蛋白質が増殖分化因子としての活性を備えていることは、その受容体を発現する細胞の増殖や分化を観察することにより確認することができる。受容体発現細胞の同定には、組み換え蛋白質をアフィニティープローブとして利用できる。より具体的には、下記の方法を例示することができる。

(1) 受容体発現が同定された細胞、もしくは既知増殖因子受容体やそのホモログを発現する細胞を候補蛋白質の存在下で培養する。

(2) 細胞の増殖や分化の状態を観察し、陰性対照や既知の増殖分化因子存在下での結果と比較する。

候補蛋白質の増殖刺激活性は、細胞数の計測、[³H]-thymidineの取り込みなどの方法によって評価できる。一般に血液前駆細胞の分化誘導作用は、前駆細胞コロニー形成に対する影響を調べることにより評価されている。このような評価方法は公知である("Colony Assays of Hematopoietic Cells Using Methylcellulose Media," An Introductory Technical Manual, Terry Fox Laboratory Media Preparation Service, Vancouver (1992))。このとき、必要に応じて、IL-3、IL-6や幹細胞因子(stem cell factor; SCF)等の造血細胞に作用するサ

イトカインなどを組み合わせることにより、増殖分化因子としての活性をより明瞭に検出することができる。

また実験動物に候補蛋白質を投与（皮下・静脈など）し、血液パラメータ、血清生化学値、病理像等を調べることにより、組み換え蛋白質が有する血液前駆細胞に対する作用を調べることができる。また、候補蛋白質をコードする遺伝子を過剰発現するトランスジェニック動物を作成することによっても、同様にその機能を評価することもできる。

また、PSEC137と機能的に同等な蛋白質は、当業者に周知のハイブリダイゼーション技術、あるいは遺伝子増幅技術を利用して単離することも可能である。即ち、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術(*Current Protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al., 1987: Publish. John Wiley and Sons Section 6.3-6.4)を用いてPSEC137をコードするDNA配列（配列番号：1）またはその一部をもとにこれと相同性の高いDNAを単離して、該DNAからこれら蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることは、通常行いうことである。このようにPSEC137をコードするDNAとハイブリダイズするDNAにコードされる蛋白質であって、これら蛋白質と機能的に同等な蛋白質もまた本発明の蛋白質に含まれる。

機能的に同等な蛋白質を単離する生物としては、ヒト以外に、例えばラット、ウサギ、ニワトリ、ブタ、ウシ等が挙げられるが、これらに制限されない。

機能的に同等な蛋白質をコードするDNAを単離するためのハイブリダイゼーションのストリンジエンシーは、通常「1xSSC、0.1% SDS、37°C」程度であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42°C」程度であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65°C」程度であり、ハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有するDNAの単離を期待しうる。但し、上記SSC、SDSおよび温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション

ヨン反応時間など)を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離される蛋白質は、通常、PSEC137とアミノ酸配列において高い相同意を有する。高い相同意とは、少なくとも85%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列の同一性を指す。

その他、遺伝子增幅技術(PCR)(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al., 1987: Publish. John Wiley and Sons Section 6.1-6.4)を用いてPSEC137をコードするDNA配列(配列番号:1)の一部をもとにプライマーを設計し、PSEC137をコードするDNA配列またはその一部と相同意の高いDNA断片を単離して、これをもとにPSEC137蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることも可能である。

本発明は、また、本発明の蛋白質の部分ペプチドを含む。この部分ペプチドには、例えば、シグナルペプチドが除去された蛋白質が含まれる。さらに、抗体調製のための抗原ペプチドが含まれる。部分ペプチドが本発明の蛋白質に特異的であるためには、少なくとも7アミノ酸、好ましくは8アミノ酸以上、より好ましくは9アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる。TP0等の公知の増殖分化因子においては、N末端側に種を越えて保存された領域を含むことが知られている。そして、この領域が活性に重要な役割を果たしていることも明らかにされている。したがって、本発明による部分ペプチドにおいても、N末端側の27位から213位のアミノ酸を含む配列から選択されたアミノ酸配列からなる部分ペプチドは、様々な有用性を持つ。具体的には、第1に、本発明の蛋白質の活性をブロックすることができる抗体を得るための免疫原として有用である。第2に、本発明の蛋白質に対してアゴニストやアンタゴニストとして作用する合成ペプチドのアミノ酸配列を与えることできる。

本発明の部分ペプチドは、本発明の蛋白質に対する抗体や本発明の蛋白質の競合阻害剤の調製以外に、例えば、本発明の蛋白質に結合する受容体のスクリーニングなどに利用し得る。本発明の部分ペプチドは、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造する。

更に、本発明は、上記本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチドに関する。本発明のポリヌクレオチドとしては、本発明の蛋白質をコードしうるものであれば、その形態に特に制限はなく、cDNA の他、ゲノム DNA、化学合成 DNA、RNA なども含まれる。また、本発明の蛋白質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。本発明のポリヌクレオチドは、上記のように、PSEC137 をコードする塩基配列（配列番号：1）もししくはその一部をプローブとしたハイブリダイゼーション法やこれら塩基配列をもとに合成したプライマーを用いた PCR 法等の常法により単離することが可能である。

また、本発明は、本発明のポリヌクレオチドが挿入されたベクターに関する。本発明のベクターとしては、挿入したポリヌクレオチドを安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしては pBluescript ベクター(Stratagene 社製)などが好ましい。本発明の蛋白質を生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内で蛋白質を発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であれば pGEM ベクター（プロメガ社製）、大腸菌であれば pET ベクター (Novagen 社製)、培養細胞であれば pME18S-FL3 ベクター (GenBank Accession No. AB009864)、生物個体であれば pME18S ベクター (Mol Cell Biol. 8:466~472, 1988) などが好ましい。ベクターへの本発明のポリヌクレオチドの挿入は常法により制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる。

(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al., 1987: Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4~11.11)。

加えて本発明は、本発明のベクターを保持する形質転換体に関する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。蛋白質を高発現させるための真核細胞としては、例えば、COS 細胞、CHO 細胞などを例示することができる。配列番号：2 に示したアミノ酸配列からなる本発明の蛋白質は、TP0 と同様にいくつかの糖鎖の結合が予測される構造を備えている。N 型糖鎖修飾可能部位に相当するトリペプチド Asn-X-[Ser, Thr] (ここで X は任意のアミノ酸、[Ser, Thr] は Ser か Thr のいずれか一方を表す) は、アミノ酸配列上に 5 カ所存在し、その可能修飾位置はアミノ酸残基番号 93、174、300、341、392 にあたる。したがって、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の発現に真核細胞を用いれば、糖鎖の付加された分子を得ることができる。このような分子は、天然に存在する形態と構造的に近いものと考えられる。したがって、発現宿主として真核細胞を用いる方法は、本発明の望ましい態様を構成する。真核細胞には、特に COS 細胞や CHO 細胞等の哺乳動物細胞の利用が好ましい。

宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al., 1987: Publish. John Wiley and Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法 (G IBCO-BRL 社製)、マイクロインジェクション法などの方法で行うことが可能である。

また、本発明は、配列番号：1 に記載のポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズし、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するポリヌクレオチドに関する。本発明のポリヌクレオチドと「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくは厳格な条件下で、本発明のポリヌクレオチドとハイブリダイズし、他のポリヌクレオチドとはハイブリダイズしない

ことを意味する。このようなポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のポリヌクレオチドを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp～100bp、好ましくは15bp～35bpの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のポリヌクレオチドの少なくとも一部若しくは全部の配列を有し、少なくとも15bpの鎖長のポリヌクレオチドが用いられる。

本発明のポリヌクレオチドは、本発明の蛋白質の異常を検査・診断するために利用できる。例えば、本発明のポリヌクレオチドをプローブやプライマーとして用いたノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCRにより、発現異常を検査したり、本発明のポリヌクレオチドをプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により、ゲノムDNA-PCRやRT-PCRにより本発明の蛋白質をコードするDNAやその発現制御領域を増幅し、RFLP解析、SSCP、シークエンシング等の方法により、配列の異常を検査・診断することができる。

本発明において、「配列番号：1に記載のポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するポリヌクレオチド」には、本発明の蛋白質の発現を抑制するためのアンチセンスDNAが含まれる。アンチセンスDNAは、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp、さらに好ましくは500bp以上の鎖長を有し、通常、3000bp以内、好ましくは2000bp以内の鎖長を有する。このようなアンチセンスDNAには、本発明の蛋白質の異常(機能異常や発現異常)などに起因した疾患(特に、血液細胞の異常に関連した疾患)の遺伝子治療への応用も考えられる。該アンチセンスDNAは、例えば、本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチド(例えば、配列番号：1に記載のDNA)の配列情報を基にホスホチオエート法(Stein, 1988 *Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res 16, 3209-21, 1988*)などにより調製することが可能である。

本発明のポリヌクレオチドまたはアンチセンス DNA は、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターなどをを利用して、*ex vivo* 法や *in vivo* 法などにより患者へ投与を行う。

また、本発明は、本発明の蛋白質に結合する抗体に関する。本発明の抗体の形態には特に制限はなく、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体または抗原結合性を有するそれらの一部も含まれる。また、全てのクラスの抗体が含まれる。さらに、本発明の抗体には、ヒト化抗体などの特殊抗体も含まれる。

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体の場合には、常法に従いアミノ酸配列に相当するオリゴペプチドを合成して家兎に免疫することにより得ることが可能であり (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al., 1987: Publish. John Wiley and Sons. Section 11.12~11.13) 、一方、モノクローナル抗体の場合には、常法に従い大腸菌で発現し精製した蛋白質を用いてマウスを免疫し、脾臓細胞と骨髄腫細胞を細胞融合させたハイブリドーマ細胞の中から得ることができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al., 1987: Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4~11.11) 。

本発明の蛋白質に結合する抗体は、本発明の蛋白質の精製に加え、例えば、本発明の蛋白質の発現異常や構造異常の検査・診断に利用することも考えられる。具体的には、例えば組織、血液、または細胞などから蛋白質を抽出し、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA 等の方法による本発明の蛋白質の検出を通して、発現や構造の異常の有無を検査・診断することができる。

また、本発明の蛋白質に結合する抗体を、本発明の蛋白質に関連した疾患の治療などの目的に利用することも考えられる。抗体を患者の治療目的で用いる場合には、ヒト抗体またはヒト化抗体が免疫原性の少ない点で好ましい。ヒト抗体は、免疫系をヒトのものと入れ換えたマウス (例えば、「Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody respons

e in mice, Mendez, M.J. et al. *Nat. Genet.* 15: 146-156, 1997」参照)に免疫することにより調製することができる。また、ヒト化抗体は、モノクローナル抗体の超可変領域を用いた遺伝子組み換えによって調製することができる(Methods in Enzymology 203, 99-121, 1991)。

また、本発明は、本発明の蛋白質を利用した、本発明の蛋白質を結合する受容体をコードする遺伝子の単離方法に関する。この単離方法は、いわゆる発現クローニングの原理に基づいている。すなわち本発明に基づく受容体の単離方法は、

- (a) 遺伝子のライブラリーを発現する細胞に本発明の蛋白質を接触させる工程、
- (b) 本発明の蛋白質を結合することができるクローニングを選択する工程を含む。

更に本発明は、この方法によって取得することができる遺伝子によってコードされる受容体蛋白質に関する。本発明の蛋白質とその受容体、並びにそれらをコードする遺伝子は、両者の結合に干渉する化合物のスクリーニング方法に有用である。あるいは、この受容体を配列番号：2に示すアミノ酸配列からなる蛋白質のホモログを単離するために利用することができる。

前記単離方法に用いる遺伝子ライブラリーは、受容体の遺伝子を含む可能性を持つものであれば限定されない。このようなライブラリーには、たとえば、各種の血液細胞やその前駆細胞に由来する cDNA ライブラリーを用いることができる。より具体的には、造血幹細胞、巨核球系前駆細胞、更には巨核球系前駆細胞が分化した細胞である、前巨核芽球、巨核芽球、前巨核球、そして巨核球細胞等に由来する cDNA ライブラリーを用いることができる。これらの細胞から cDNA を調製し、更に当該 cDNA を発現ライブラリーとする方法は公知である。

リガンドとなる本発明の蛋白質を結合するクローニングの選択には、標識蛋白質を用いるのが有利である。たとえば、本発明の蛋白質を GFP のような蛍光性の蛋白質との融合蛋白質として発現させることにより、蛍光標識リガンドとすることができる。あるいは、myc タグのような免疫学的なタグとの融合蛋白質として発現させた場合には、このタグに対する抗体を使って、リガンドをトレースするこ

ともできる。このようにしてリガンドを結合するクローンを選択し、単離することによって、本発明の蛋白質の受容体をコードする遺伝子を単離することができる。

単離された受容体は、本発明の蛋白質との結合に干渉する物質のスクリーニングに用いることができる。すなわち本発明は、次の工程を含む、本発明の蛋白質とその受容体との結合に干渉する化合物をスクリーニングする方法を提供する。

(a) 前記受容体を発現する細胞と本発明の蛋白質とを、候補化合物の存在下で、または前記細胞と候補化合物を接触させた後に接触させる工程、および

(b) 本発明の蛋白質の結合量に干渉する化合物を選択する工程

前記受容体を発現する細胞としては、前記受容体を発現していることが明らかな天然の細胞を用いることができる。あるいは、本来は前記受容体を発現していないが、その遺伝子によって形質転換された細胞を利用することもできる。本発明の蛋白質の、前記受容体を発現する細胞への結合は、本発明の蛋白質を標識しておくことによって容易に確認することができる。本発明の蛋白質は、GFPのよる蛍光性蛋白質や、各種の酵素、免疫学的なタグなどの公知の方法によって標識することができる。

本発明のスクリーニング方法によって、本発明の蛋白質と同様に受容体に結合する部分ペプチドを得ることができる。このような部分ペプチドは、TPO/EPOと同様の造血系細胞の分化増殖因子としての活性を持つ可能性があり、医薬品として期待できる。あるいは逆に、本発明の蛋白質の受容体への結合を阻害し、しかもシグナル伝達を伴わない化合物においては、本発明の蛋白質の機能をよりいつそう明らかにするための研究材料として有用である。

本発明のスクリーニング方法により単離された化合物を医薬品として用いる場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤

などと適宜組み合わせて製剤化して投与することが考えられる。患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射など当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

また、本発明は、本発明の蛋白質の発現が改変されるように操作された非ヒト脊椎動物を提供する。ここで「発現の改変」には、発現の増強および減弱が含まれる。また、「蛋白質の発現の改変」は、転写と翻訳のいずれのステップの改変も含まれる。このような非ヒト脊椎動物には、内因性の本発明の蛋白質の発現を停止または減少させるように操作された動物（ノックアウト動物）および外来性の本発明の蛋白質を発現するように該蛋白質をコードする遺伝子が導入された動物（トランスジェニック動物）が含まれる。このようなノックアウトおよびトランスジェニック非ヒト脊椎動物は、文献「ニューロサイエンス・ラボマニュアル3、神経生物学のための胚と個体の遺伝子操作法（編集・近藤寿人、シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社）」に従って作製することができる。

例えば、本発明のPSEC137蛋白質をコードするDNAが染色体に組込まれたトランスジェニック動物を作製することにより、これらの蛋白質の発現を上昇させたり、発現パターンや分布の改変を行うことができる。また、これらの内因性遺伝子の発現制御領域に変異を導入したり、他の発現制御領域を付加または置換することなどにより、本来の遺伝子の発現レベルと比較して人工的に転写レベルを上昇、下降、または発現パターンや分布の改変を行うことができる。一方、エキソンの一部を欠損させたり、翻訳領域への点突然変異の導入により終止コドンへ置換することにより、蛋白質への翻訳を修飾することもできる。また、アンチセン

ス RNA やリボザイムを発現させることで、PSEC137 遺伝子の発現を制御することも可能である。これらの変異の導入は、公知の方法により行うことができる。

このような非ヒト脊椎動物は、転写機能の研究、転写に関連する疾患のメカニズムの解明、医薬品のスクリーニング等に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の PSEC137 蛋白質のアミノ酸配列と既知の TP0 蛋白質 (a) 、および EP0 蛋白質 (b) のアミノ酸配列の比較結果を示す図である。同一のアミノ酸は「:」で、相同なアミノ酸は「.」で示した。

図 2 は、本発明の PSEC137 蛋白質のアミノ酸配列と、megakaryocyte stimulating factor (Genbank Accession, U70136)との比較結果を示す図である。両者の構成アミノ酸が共通の場合にはそのアミノ酸を示す 1 文字コードを記載した。相同なアミノ酸は「+」で示した。

図 3 は、本発明の PSEC137 蛋白質のアミノ酸配列において、C 末端領域に見出された、PFAM thrombospondin type 1 domain を示す図である。

図 4 は、PSEC137 遺伝子の組織分布の解析結果を示す写真である。 (a) はノーザンプロットの結果を、(b) は RT-PCR の結果を示している。

図 5 は、チオアフィニティ精製による PSEC137 蛋白質の精製結果を示す写真である。アミノ酸配列より予想される PSEC137 融合蛋白質の推定分子量は 78.6kDa である。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

〔実施例 1〕 PSEC137 の単離

ヒト胎盤組織から、文献 (J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, Molecular Cloning Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 記載の方法により mRNA を抽出した。さらに、オリゴ dT セルロースで poly (A)⁺RNA を精製した。

poly(A)⁺RNA よりオリゴキャップ法 [M. Maruyama and S. Sugano, Gene, 138: 171-174 (1994)]により cDNA ライブライマーを作成した。Oligo-cap linker(ag caucgagu cggccuuguu ggccuacugg／配列番号：3)およびオリゴ dT ブライマー(g cggctgaag acggcctatg tggccttttt ttttttttt tt／配列番号：4)を用いて文献 [鈴木・菅野, 蛋白質 核酸 酶素, 41: 197-201 (1996)、Y. Suzuki et al., Gene, 200: 149-156 (1997)]の記載にしたがって BAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) 処理、TAP (Tobacco Acid Phosphatase) 処理、RNA ライゲーション、第一鎖 cDNA の合成と RNA の除去を行った。次いで、5' (agcatcgagt cggccttgg／配列番号：5) と 3' (gcggctgaag acggcctatg t／配列番号：6) の PCR ブライマーを用い PCR (polymerase chain reaction) により 2 本鎖 cDNA に変換し、Sfi I 切断した。次いで、DraIII で切断したベクター pME18SFL3 に cDNA の方向性を決めてクローニングし、cDNA ライブライマーを作成した。これらより得たクローニングのプラスミド DNA について、挿入 cDNA サイズが 1 kb 以下のクローニングを除いた後、cDNA の 5' 端と 3' 端の塩基配列を DNA シーケンシング試薬 (Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit または BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, PE Biosystems 社製) を用い、マニュアルに従ってシーケンシング反応後、DNA シーケンサー (ABI PRISM 377, PE Biosystems 社製) で DNA 塩基配列を解析した。

オリゴキャップ法で作製したライブライマーの cDNA の 5' - 末端の全長率を次の方法で求めた。公共データベース中のヒト既知 mRNA と 5' - 末端配列が一致する全クローニングについて、公共データベース中の既知 mRNA 配列より長く 5' - 末端が

伸びている場合と 5'-末端は短いが翻訳開始コドンは有している場合を「全長」と判断し、翻訳開始コドンを含んでいない場合を「非全長」と判断した。各ライブラリーでの cDNA クローンの 5'-末端の全長率 [全長クローン数 / (全長クローン数 + 非全長クローン数)] をヒト既知 mRNA と比較することにより求めた。その結果、このライブラリーの全長率は 6.2% であり、5'-端配列の全長率が非常に高いことが分かった。

次に、ATGpr と ESTiMateFL を用いて、cDNA の 5'-末端の全長率を評価した。

ATGpr は、ATG コドンの周辺の配列の特徴から翻訳開始コドンであるかどうかを予測するためにヘリックス研究所の A. A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Swindells により開発したプログラムである [A. A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Swindells, Bioinformatics, 14: 384-390 (1998); <http://www.hri.co.jp/atgpr/>]。結果は、その ATG が真の開始コドンである期待値を表した (0.05-0.94)。その結果、PSEC137 の ATGpr1 値は、0.94 であった。

ESTiMateFL は、公共データベース中の EST の 5'-末端配列や 3'-末端配列との比較による全長 cDNA の可能性の高いクローンを選択するヘリックス研究所の西川・太田らにより開発された方法である。

この方法は、ある cDNA クローンの 5'-末端や 3'-末端配列よりも、長く伸びた EST が存在する場合には、そのクローンは「全長ではない可能性が高い」と判断する方法で、大量処理可能なようにシステム化したものである。公共データベース中の EST 配列より長く 5'-末端が伸びている場合、および 5'-末端が短いクローンでも両者の差が 50 塩基以内である場合を便宜的に全長とし、それ以上短い場合を非全長とした。EST との比較による完全長らしさの評価では、比較対照とする EST の数が多ければ予測精度は高まるが、対象 EST が少ない場合には予測結果の信頼性が低くなる欠点はある。この方法は、5'-末端配列での全長率が約 6.0% のオリゴキヤップ法による cDNA クローンから全長ではない可能性の高いクローンを排除するのに使えば有効である。また、ESTiMateFL は、公共データベ

スへの EST 登録が適當数あるヒト未知 mRNA の cDNA の 3'-末端配列の全長性を評価するには、特に有効な方法である。

次に、オリゴキヤップ法で作成したライブラリーのクローンから、5'-末端配列の中のすべての ATG コドンから予測される推定アミノ酸配列について、中井・金久が開発した蛋白質の局在性予測プログラム「PSORT」[K. Nakai & M. Kanehisa, *Genomics*, 14: 897-911 (1992)]を用い、多くの分泌蛋白質のアミノ末端に特徴的なシグナルペプチドと予測される配列の有無を解析することにより、シグナル配列をもつと予測されるクローン（分泌蛋白質、または膜蛋白質の可能性が高い）を特異的に選別した。その結果、PSEC137 は、分泌蛋白質、または膜蛋白質で N-末端にシグナル配列が存在し、全長 cDNA クローンであることが予測された。

更にこうして選択したクローンについて、全長 cDNA の塩基配列、並びに推定アミノ酸配列を決定した。塩基配列は、次に示す 3 種の方法を組み合わせ、各方法によって決定した塩基配列を完全にオーバーラップさせ、最終的な確定塩基配列を決定した。

(1) Licor DNA シーケンサーを用いた cDNA 挿入断片両末端からのロングリードシーケンス (Licor シーケンサー (アロカ社販売) のマニュアルに従ってシーケンシング反応後、Licor シーケンサーで DNA 塩基配列を解析した)、

(2) AT2 トランスポゾン試験管内転移を用いた Primer Island 法によるネストドシーケンス [S. E. Devine and J. D. Boeke, *Nucleic Acids Res.*, 22: 3765-3772, (1994)] (PE Biosystems 社製のキットとマニュアルにしたがってクローンを取得後、PE Biosystems 社製の DNA シーケンシング試薬でマニュアルに従ってシーケンシング反応し、ABI PRISM 377 で DNA 塩基配列を解析した)

(3) カスタム合成 DNA プライマーを用いたダイテオキシターミネーター法によるプライマーウォーキング (カスタム合成 DNA プライマーをもちい PE Biosyste

MS 社製の DNA シーケンシング試薬でマニュアルに従ってシーケンシング反応し、 ABI PRISM 377 で DNA 塩基配列を解析した)

これらの配列について、 ATGpr と PSORT による解析および GenBank や SwissProt に対する BLAST 解析を行った。その結果、 PSEC137 は、分泌蛋白質、または膜蛋白質で N-末端にシグナル配列が存在し、全長 cDNA クローンであると予測された。

〔実施例 2〕 蛋白質相同性解析

予想される PSEC137 蛋白質のアミノ酸配列についてモティーフ検索および既知蛋白質に対する相同性解析を行った。単離した PSEC137 cDNA は、 571 残基のアミノ酸配列 (配列番号 : 2) からなる蛋白質をコードしている。シグナル配列・蛋白質局在予想プログラム PSORT (Trends Biochem Sci. 1999 Jan;24(1):34-6.) により、 PSEC137 は 26 残基のシグナル配列を有し、アミノ酸 545 残基 (アミノ酸 27-571 残基) を成熟型とする分泌蛋白質であることが予想された。BLOCK S library (Nucl. Acids Res. 27:226-228 (1999)) に対する検索より、 erythropoietin (EP0)/ thrombopoietin (TP0) 蛋白質様の配列断片 (BL00817) が低スコアで同定されたことから、 PSEC137 蛋白質とヒト EP0, TP0 とそれぞれ二者間での配列比較を行った (SwissProt Accession. はそれぞれ、 P01588, P40225) 。

PSEC137 蛋白質 N 末端 213 残基は、 TP0 活性断片を含む N 末端 215 残基に対し 23.9% の同一性を示し、 EP0193 残基に対しては、 23.1% の相同性を示した (図 1) 。蛋白質非重複データベースに対する BLAST 検索により、 megakaryocyte stimulating factor (Genbank Accession, U70136) との相同性が示された (図 2) 。 C 末端領域では、 PFAM thrombospondin type 1 domain が同定された (図 3) 。 PSEC137 蛋白質配列上には既存の蛋白質モティーフ属さない繰り返し配列が存在し (アミノ酸残基番号 47-127 と 128-208) 、その配列は 84% 同一である。

〔実施例3〕遺伝子組織発現分布

PSEC137 遺伝子の組織発現分布をノーザンプロットおよび RT-PCR 法により解析した。PSEC137 StuI 遺伝子断片(243bp)を切り出し、RTG DNA Labelling Beads (dCTP) (アマシャムファルマシアバイオテク)を用いて ^{32}P -dCTP でラベルしプローブを調製した。ヒト 12 純粋な mRNA がプロットされたフィルター(Human 12-Lane MTN Blot; クローンテック社)を用いて、ExpressHyb hybridization solution (クローンテック) 中にて、製造者の指示に従い、ハイブリダゼーションを行い、製造者の示す high stringency 条件でプローブを洗い落とした。

Human MTC Panel (クローンテック)を用いて、RT-PCR による組織発現解析を行った。增幅の際に用いたプライマーは以下の通りである。

hPSEC137FOR : GCTTCTGCCTGCGTCCATGCTGTCTG (配列番号 : 7)

hPSEC137REV : GGCACACAGCCTCGGACCAACCTCACT (配列番号 : 8)

PCR のための耐熱性 DNA ポリメラーゼとして AmpliTaq Gold (PE アプライドバイオシステムズ) を選択し、製造者の指示通りに反応液を調整した。プライマーの終濃度は 200nM であった。反応サイクルは 94°C 10min の後、40 サイクルの 94°C 30sec, 55°C 30sec, 72°C 30sec であった。

図4 にノーザンプロット (a) および RT-PCR の結果 (b) を示す。ノーザンプロットで約 3.0kb の転写産物が胎盤において検出された。このサイズは実施例 1 で示したクローニングした遺伝子配列全長と矛盾のない結果である。強い遺伝子発現は胎盤に限局しており、前立腺、精巣、腎（胎児期も含む）、脾に弱い発現が見られた。その発現が胎盤に限局して強く起こっていることより、PSEC137 産物の妊娠の成立維持、胎児生育維持への関与が示唆される。

〔実施例4〕PSEC137 蛋白質の調製

組み換え PSEC137 蛋白質は様々な発現システムにより生産することができる。例えばシグナル配列を除去した PSEC137 を組み換えチオレドキシン融合蛋白

質として発現可能である。pET-32a(Novagen)にシグナル配列を除去したPSEC137構造遺伝子を導入し、発現ベクターを構築した。PSEC137遺伝子を二つのプライマー-5' -ctccccgtgaagaagccgcggctc-3' (配列番号: 9) と 5' -gcaagcttctagtactccttggcctcctgcaa-3' (配列番号: 10) を用いてPCR増幅し、この断片をHindIIIで消化後、EcoRVとHindIIIで消化したpET32aへクローニングした。構築した発現ベクターでBL21(DE3)trxB株を形質転換し、Isopropyl β -D(-)-Thio galactopyranoside添加により発現誘導を行った。培養温度を30°Cにして発現誘導を行うことにより、約50%を可溶性蛋白質として回収できた。

以下、可溶性画分からの精製について例示する。培養(100mL)を27°Cにて行い、発現誘導を行ってから更に培養した培養液を遠心し、そのペレットを-80°Cのフリーザーにストックした。ペレットを氷上にて溶解後、5mLのプロテアーゼ阻害剤を含むバクテリア蛋白質抽出液B-PER (PIERCE)に懸濁した。室温にて10分間放置した後、遠心、上清を22 μ m濾過し、これをチオレドキシンに対するアフィニティ精製 (ThioBond Resin: Invitrogen) に供した。バッチにて結合後(1mL resin)、カラムにパックし、1mM 2-mercaptoethanol (2-ME)含有Tris buffer saline (pH 7.4)にて洗浄した。その後、それぞれ3mLの5, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 mM 2-メルカプトエタノール(2-ME)にて溶出し、それぞれ集めた画分をSDS-PAGEおよびウエスタンプロットにて分析した。目的とするPSEC137融合蛋白質を、上記の条件にて樹脂に結合させ、50-200 mM 2-MEで溶出することにより部分精製が可能であった(図5)。

産業上の利用の可能性

本発明によって、新規な蛋白質PSEC137とそれをコードする遺伝子が提供された。PSEC137はTP0/EPO様のアミノ酸配列を含む蛋白質である。したがって、この蛋白質は増殖分化因子として有用である。本発明の蛋白質は、例えば血液系細胞に関する分化増殖活性が期待できる。この活性を利用すれば、造血作用を持つ

新規な医薬品とすることができます。一方本発明の遺伝子は、この蛋白質の製造に有用である。

また本発明の蛋白質をリガンドとして、血液系細胞が持つ増殖分化因子の新規な受容体を取得することができる。

請求の範囲

1. 下記 (a) から (f) のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
 - (a) 配列番号 : 1 に記載された塩基配列の蛋白質コード領域を含むポリヌクレオチド。
 - (b) 配列番号 : 2 に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするポリヌクレオチド。
 - (c) 配列番号 : 2 に記載に記載されたアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号 : 2 に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド。
 - (d) 配列番号 : 1 に記載された塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、配列番号 : 2 に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド。
 - (e) 配列番号 : 2 に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド。
 - (f) 配列番号 : 2 に記載に記載されたアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号 : 2 に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド。
2. 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質またはその部分ペプチド。
3. 配列番号 : 2 における N 末端側の 27 から 213 アミノ酸残基から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載の部分ペプチド。
4. 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドが挿入されたベクター。

5. 請求項 1 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 4 に記載のベクターを保持する形質転換体。
6. 請求項 5 に記載の形質転換体を培養し、発現産物を回収する工程を含む、請求項 2 に記載の蛋白質またはその部分ペプチドの製造方法。
7. 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドのいずれか、またはその相補鎖にハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を持つポリヌクレオチド。
8. 請求項 7 に記載のポリヌクレオチドからなる、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド合成用プライマー。
9. 請求項 7 に記載のポリヌクレオチドからなる、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの検出用プローブ。
10. 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドもしくはその一部に対するアンチセンス DNA。
11. 請求項 2 に記載の蛋白質の受容体をコードする遺伝子を単離する方法であつて、
 - (a) 遺伝子のライブラリーを発現する細胞に請求項 2 に記載の蛋白質を接觸させる工程、および
 - (b) 請求項 2 に記載の蛋白質と結合することができるクローンを選択する工程、を含む方法。
12. 請求項 11 に記載の方法によって単離されうる請求項 2 に記載の蛋白質の受容体をコードする遺伝子。
13. 請求項 12 に記載の遺伝子によってコードされる請求項 2 に記載の蛋白質の受容体。
14. 請求項 2 に記載の蛋白質とその受容体との結合に干渉する化合物をスクリーニングする方法であつて、

(a) 請求項 2 に記載の蛋白質の受容体を発現する細胞と請求項 2 に記載の蛋白質とを、候補化合物の存在下で、または前記細胞と候補化合物を接触させた後に接触させる工程、および

(b) 請求項 2 に記載の蛋白質の結合量に干渉する化合物を選択する工程、を含む方法。

15. 請求項 14 に記載の方法により単離されうる、請求項 2 に記載の蛋白質とその受容体との結合に干渉する化合物。

16. 請求項 2 に記載の蛋白質の発現が改変されるように操作された非ヒト脊椎動物。

17. ノックアウト動物またはトランスジェニック動物である、請求項 16 に記載の非ヒト脊椎動物。

18. マウスである、請求項 17 に記載の非ヒト脊椎動物。

1/5

図 1

(a) PSEC137 213 aa vs. TPO 215 aa 23.9% identity;

| | | | | | | | | |
|---------|----------------------------------|--------------|----------------|-----------------------|---------------------|-------------|--------------------------------|----|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | | | |
| psec137 | MRALRDRAGLLC | VLLL | AA | ALGLPV | KPRLRGPRPGS-LTRLAEV | -----SASPDP | | |
| tpo | MELTE | --- | LLL | VVML | --- | LLTARLT | SSPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLSRLSQCP | EV |
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | | | |
| | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | | | |
| psec137 | RPLKEEEEAPLLP | ----- | RTHLQAEPHQH | --GCWTVTEPAAMTPGNTTPR | --TPEVTP | | | |
| tpo | HPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQMEETKAQDIL | C | GAVT | LLLEG | VM | ARGQLGPTCL | SSLLGQ | |
| | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | | | |
| | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | | |
| psec137 | LRLELQKLPGLASTTL | STP | -NPDTQASASPDPR | PLREEEEARLL | PRTHLQAE | LHQHG | CWT | |
| tpo | LSGQVRLLL | GALQSLL | GTQLPPQGRTTA | HKDPNA | IFLSFQHLLRGK | VRF | --LMLVGGST | |
| | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | | |
| | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | | | |
| psec137 | VTEPAALTPGNATPPRT | QEVTP | PLL | ELQKLPEL | VHATL | STP | NPDNQVT | IK |
| tpo | LCVRRA | -PPTTAVPSRTS | --- | LVLT | LNELPNRTSG | LL | ETNFTASARTTG | |
| | 180 | 190 | 200 | 210 | | | | |

(b) PSEC137 213 aa vs. EPO 193 aa 23.1% identity;

| | | | | | | | | | |
|---------|--------------|--------|-----------|-----------|--------|---------------|----------|---------|----------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | | | | |
| psec137 | MRALRDRAGLLC | --- | VLLL | AA | ALGLPV | -KKPRLRGPRPGS | LTRLAEV | SASPDP | |
| EPO | M | ----- | GVHECPAWL | WLLS | SLL | PLGLP | VLGAP | -----RY | |
| | 10 | 20 | 30 | 40 | | | | | |
| | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | | | |
| psec137 | LKEEEEAPLL | PRTHL | QAE | PHQHG | CWT | VTEPAAM | TPGNTTPR | PEVTPLR | LELQKLPG |
| EPO | LLEAKEAEN | --- | TTGCAE | -HCSLNEN | ITVPD | --TKVN | FYAWKRME | VGQQ | EVWQ |
| | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | | | | |
| | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | | | |
| psec137 | STTL | STPN | PDT | QASASPD | -RPL | REEEEARLL | PRTHL | QAE | LHQHG |
| EPO | LL | SEAVL | RGQALL | VNSSQP | WEPLQL | HVDKA | VSGLRS | LTLL | RALGAQKE |
| | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | | | |
| | 180 | 190 | 200 | 210 | | | | | |
| psec137 | NATPPRT | QEVTP | PLL | LELQKLPEL | VHATL | STP | NPDNQVT | -K | |
| EPO | SAAPLRT | ITADTF | RKLFRVYSN | FLRGK | KLYT | GEACRT | GDR | | |
| | 160 | 170 | 180 | 190 | | | | | |

2/5

図2

Score = 135 (47.5 bits), Expect = 6.5e-05, P = 6.5e-05
Identities = 57/210 (27%), Positives = 79/210 (37%)

Query: 29 VKKPRLRGPRPGSLTRLAEVSASPDPRPLKEEEEAPLLPRTHLQAEPHQHGCWTVTEPAA 88
+K+P P+ + LA + +P ++ AP P+ P+ T EPA
Sbjct: 717 LKEPAPTPKKPAPKELAPTTK-EPTSTTSdkPAPTPKGTAAPTPKEPAPTPKEPAP 775

Query: 89 MTPGNTTTPRTPEVTLRLELQKLPGLASTTLSTPNPDTQASASPDPRPLREEEEARLLP 148
TP T P E P + LA TT P T S P P +E A P
Sbjct: 776 TTPKGTAAPTLKEPAPTPKKPAPKELAPTTKGPTSTT---SDKPAPTPKETAPTP 831

Query: 149 RTHLQAEHQHGCWTVTEPAALTPGNATPPRTQEV-TPLLLELQKLPELVHATL--STPN 205
+ T +PA TP PP T EV TP K P +H + STP
Sbjct: 832 KEPAPT-----TPKKPAPTP-ETPPPTSEVSTPTT--KEPTTIHKSPDESTPE 879

Query: 206 PDNQVTIKVVEDPQAEVSIDLALAEPSNPPPQDT 238
+ T K +E+ E + P+ P+ T
Sbjct: 880 LSAEPTPKALENSPKEPGVPTTKTPAATKPEMT 912

3/5

☒ 3

Report scores above: 17.00

Scan window size: 1000

Do complementary strand: no

Fancy alignment output: yes

[Printing multiple non-overlapping hits per sequence]

44.35 (bits) f: 330 t: 370 Target: PSEC137

Alignment to HMM consensus:

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|-----------|----------|--------|------|-----|-------|-------|---------|-----|------|-----|------|----|----|
| *SPW | sEWSPCSVT | CGM | GMR | Rq | RNC | NmP | fPM | gGe | PC | tgD | vQE | ETEM | Cn | MM |
| +WS | +WSPCS | C | +G | +R | R | C | | | CT | + | T | +C | + | |
| PSEC137 | 330 | KEWSPWSP | PCSGNC | STGK | QQR | TRPCG | ----- | YGCTATE | --- | TRTC | -DL | 367 | | |

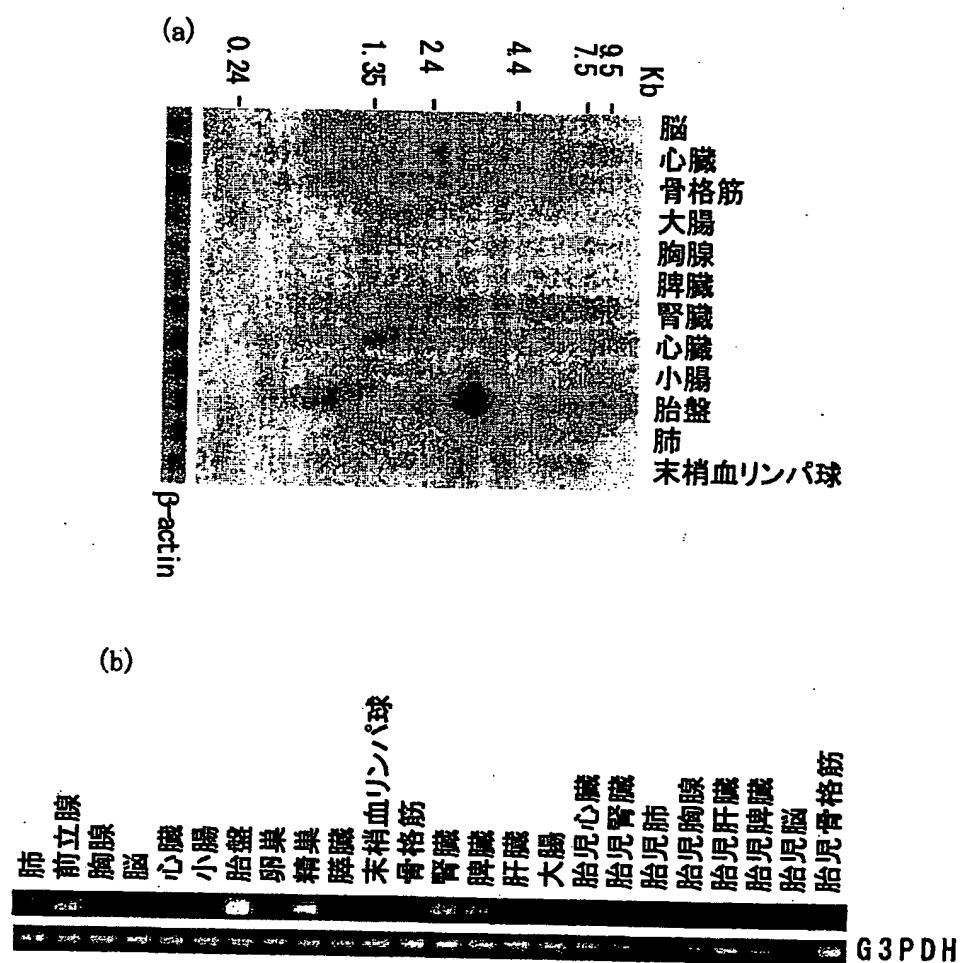
dPC*

+ C

PSEC137 368 PSC 370

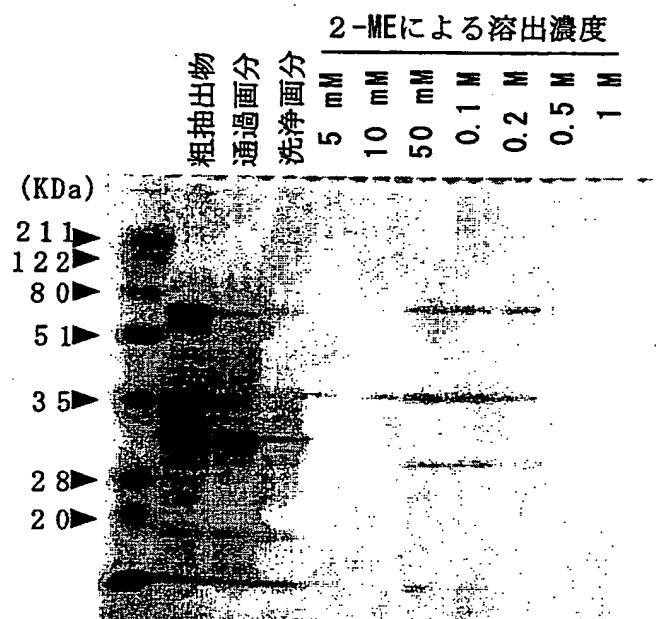
4/5

図4



5/5

図 5



1/12

SEQUENCE LISTING

<110> Helix Research Institute

<120> Differentiation Growth Factor

<130> H1-106PCT3

<140>

<141>

<150> JP 1999-194179

<151> 1999-07-08

<150> US 60/159586

<151> 1999-10-18

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2981

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (58)..(1770)

<400> 1

gactgggttc gcggccgcgt gcagaggtgc aggccagagca gcctcggaac cgagacg 57

atg cgt gcg ctc cgc gac cga gcc ggg ctc ctc ctc tgc gtg ctg ctg 105
Met Arg Ala Leu Arg Asp Arg Ala Gly Leu Leu Leu Cys Val Leu Leu

2/12

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ctg | gct | gct | ctg | ctg | gag | gct | gct | ctg | ggg | ctc | ccc | gtg | aag | aag | ccg | 153 |
| Leu | Ala | Ala | Leu | Leu | Glu | Ala | Ala | Leu | Gly | Leu | Pro | Val | Lys | Lys | Pro | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| cg | ctc | cg | gga | cca | cg | cct | gg | ag | ctc | ac | ag | c | ca | gag | gtc | 201 |
| Arg | Leu | Arg | Gly | Pro | Arg | Pro | Gly | Ser | Leu | Thr | Arg | Leu | Ala | Glu | Val | |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| tca | gcc | tcc | cca | gat | cct | agg | cct | ctg | aag | gaa | gag | gag | gag | gca | cca | 249 |
| Ser | Ala | Ser | Pro | Asp | Pro | Arg | Pro | Leu | Lys | Glu | Glu | Glu | Glu | Ala | Pro | |
| | | | 50 | | | | | 55 | | | | 60 | | | | |
| ctg | ctc | ccc | aga | acc | cac | ctg | cag | gca | gag | cca | cac | caa | cat | gga | tgc | 297 |
| Leu | Leu | Pro | Arg | Thr | His | Leu | Gln | Ala | Glu | Pro | His | Gln | His | Gly | Cys | |
| | | | 65 | | | 70 | | | | 75 | | | 80 | | | |
| tgg | act | gtc | act | gag | cca | gca | gcc | atg | acc | cca | ggc | aac | acc | acc | cct | 345 |
| Trp | Thr | Val | Thr | Glu | Pro | Ala | Ala | Met | Thr | Pro | Gly | Asn | Thr | Thr | Pro | |
| | | | 85 | | | | | 90 | | | | 95 | | | | |
| ccc | agg | acc | cca | gag | gtt | act | ccg | ttg | cgg | ctg | gag | ctg | cag | aag | ctg | 393 |
| Pro | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Pro | Leu | Arg | Leu | Glu | Leu | Gln | Lys | Leu | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | 110 | | | | |
| ccg | gga | ttg | gcc | agc | aca | acc | ttg | agt | acc | cct | aac | cct | gat | acc | cag | 441 |
| Pro | Gly | Leu | Ala | Ser | Thr | Thr | Leu | Ser | Thr | Pro | Asn | Pro | Asp | Thr | Gln | |
| | | | 115 | | | | 120 | | | | 125 | | | | | |
| gct | tca | gcc | tcc | cca | gat | cct | agg | cct | ctg | agg | gaa | gag | gag | gag | gca | 489 |
| Ala | Ser | Ala | Ser | Pro | Asp | Pro | Arg | Pro | Leu | Arg | Glu | Glu | Glu | Glu | Ala | |
| | | | 130 | | | 135 | | | | 140 | | | | | | |
| cga | ctg | ctc | ccc | aga | acc | cac | ctg | cag | gca | gag | cta | cac | caa | cat | gga | 537 |
| Arg | Leu | Leu | Pro | Arg | Thr | His | Leu | Gln | Ala | Glu | Leu | His | Gln | His | Gly | |
| | | | 145 | | | | 150 | | | 155 | | | 160 | | | |
| tgt | tgg | act | gtc | act | gag | cca | gca | gcc | ctg | acc | cca | ggg | aat | gcc | acg | 585 |

3/12

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Cys | Trp | Thr | Val | Thr | Glu | Pro | Ala | Ala | Leu | Thr | Pro | Gly | Asn | Ala | Thr | |
| | | | | | | | 165 | | | 170 | | | | 175 | | |
| cct ccc agg acc cag gag gtt act ccc ttg ctg ctg gag ctg cag aag 633 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pro | Pro | Arg | Thr | Gln | Glu | Val | Thr | Pro | Leu | Leu | Glu | Leu | Gln | Lys | | |
| | | | | | | | 180 | | | 185 | | | | 190 | | |
| ctg cca gaa ttg gtc cac gca acc ttg agt acc cct aac cct gat aac 681 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu | Pro | Glu | Leu | Val | His | Ala | Thr | Leu | Ser | Thr | Pro | Asn | Pro | Asp | Asn | |
| | | | | | | | 195 | | | 200 | | | | 205 | | |
| cag gtg acc atc aag gtg gtg gag gac ccc cag gcc gag gtg tcg ata 729 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gln | Val | Thr | Ile | Lys | Val | Val | Glu | Asp | Pro | Gln | Ala | Glu | Val | Ser | Ile | |
| | | | | | | | 210 | | | 215 | | | | 220 | | |
| gac ctg ttg gct gag ccc agc aat ccc ccg ccc cag gat acc ctt agc 777 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Asp | Leu | Leu | Ala | Glu | Pro | Ser | Asn | Pro | Pro | Gln | Asp | Thr | Leu | Ser | | |
| | | | | | | | 225 | | | 230 | | | | 240 | | |
| tgg ctg ccc gcc ctc tgg ccc ttc ctc tgg gga gac tac aaa gga gag 825 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Trp | Leu | Pro | Ala | Leu | Trp | Pro | Phe | Leu | Trp | Gly | Asp | Tyr | Lys | Glu | | |
| | | | | | | | 245 | | | 250 | | | | 255 | | |
| gaa aaa gac agg gcc cca ggg gag aag ggg gag gaa aag gag gaa gac 873 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Glu | Lys | Asp | Arg | Ala | Pro | Gly | Glu | Lys | Gly | Glu | Glu | Lys | Glu | Glu | Asp | |
| | | | | | | | 260 | | | 265 | | | | 270 | | |
| gag gac tat cct tca gag gat atc gag ggt gag gat caa gag gac aaa 921 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Glu | Asp | Tyr | Pro | Ser | Glu | Asp | Ile | Glu | Gly | Glu | Asp | Gln | Glu | Asp | Lys | |
| | | | | | | | 275 | | | 280 | | | | 285 | | |
| gag gaa gat gag gaa gag cag gcg ctc tgg ttc aat gga act aca gac 969 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Glu | Glu | Asp | Glu | Glu | Glu | Gln | Ala | Leu | Trp | Phe | Asn | Gly | Thr | Thr | Asp | |
| | | | | | | | 290 | | | 295 | | | | 300 | | |
| aac tgg gac cag ggc tgg ctg gcc ccc ggg gat tgg gtc ttc aag gat 1017 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Asn | Trp | Asp | Gln | Gly | Trp | Leu | Ala | Pro | Gly | Asp | Trp | Val | Phe | Lys | Asp | |

4/12

| 305 | 310 | 315 | 320 | |
|---|-----|-----|-----|------|
| tct gtc agc tac gac tat gag cct cag aag gag tgg agt ccc tgg tct | | | | 1065 |
| Ser Val Ser Tyr Asp Tyr Glu Pro Gln Lys Glu Trp Ser Pro Trp Ser | | | | |
| 325 | | 330 | | 335 |
| ccc tgc agt ggg aac tgc agc act ggc aag cag cag agg act cgg ccc | | | | 1113 |
| Pro Cys Ser Gly Asn Cys Ser Thr Gly Lys Gln Gln Arg Thr Arg Pro | | | | |
| 340 | | 345 | | 350 |
| tgt ggc tat ggc tgc act gcc acc gag acc cgt acc tgt gac ctg ccc | | | | 1161 |
| Cys Gly Tyr Gly Cys Thr Ala Thr Glu Thr Arg Thr Cys Asp Leu Pro | | | | |
| 355 | | 360 | | 365 |
| tcc tgt cct ggc act gag gac aag gac acc ttg ggc ctc ccc agt gag | | | | 1209 |
| Ser Cys Pro Gly Thr Glu Asp Lys Asp Thr Leu Gly Leu Pro Ser Glu | | | | |
| 370 | | 375 | | 380 |
| gag tgg aag ctc ctg gcc cgc aat gct acg gac atg cat gat caa gat | | | | 1257 |
| Glu Trp Lys Leu Leu Ala Arg Asn Ala Thr Asp Met His Asp Gln Asp | | | | |
| 385 | | 390 | | 395 |
| 395 | | | | 400 |
| gtg gac agc tgt gag aag tgg ctg aac tgc aag agc gac ttc cta atc | | | | 1305 |
| Val Asp Ser Cys Glu Lys Trp Leu Asn Cys Lys Ser Asp Phe Leu Ile | | | | |
| 405 | | 410 | | 415 |
| aag tat ctg agc cag atg ctg cgg gac ctg ccc agc tgc ccg tgt gcc | | | | 1353 |
| Lys Tyr Leu Ser Gln Met Leu Arg Asp Leu Pro Ser Cys Pro Cys Ala | | | | |
| 420 | | 425 | | 430 |
| 430 | | | | 435 |
| tac cca ctg gag gcc atg gac agc cct gtg agc cta cag gac gag cac | | | | 1401 |
| Tyr Pro Leu Glu Ala Met Asp Ser Pro Val Ser Leu Gln Asp Glu His | | | | |
| 435 | | 440 | | 445 |
| 445 | | | | 450 |
| cag ggc cgc agc ttc cgg tgg agg gat gcc agt ggc cct cgc gag cgc | | | | 1449 |
| Gln Gly Arg Ser Phe Arg Trp Arg Asp Ala Ser Gly Pro Arg Glu Arg | | | | |
| 450 | | 455 | | 460 |
| 460 | | | | 465 |

5/12

ctg gac atc tac cag ccc acg gcg cgc ttc tgc ctg cgt tcc atg ctg 1497
Leu Asp Ile Tyr Gln Pro Thr Ala Arg Phe Cys Leu Arg Ser Met Leu
465 470 475 480

tct ggg gag agc agc aca ctg gcc gcc cag cac tgc tgc tat gac gag 1545
Ser Gly Glu Ser Ser Thr Leu Ala Ala Gln His Cys Cys Tyr Asp Glu
485 490 495

gac agc cgg ctg ctg acc cgt ggc aag ggc gcc ggc atg ccc aac ctc 1593
Asp Ser Arg Leu Leu Thr Arg Gly Lys Gly Ala Gly Met Pro Asn Leu
500 505 510

atc agc acc gac ttc tca cct aag ctg cac ttc aag ttc gac acg acg 1641
Ile Ser Thr Asp Phe Ser Pro Lys Leu His Phe Lys Phe Asp Thr Thr
515 520 525

ccc tgg atc ctg tgc aag ggg gac tgg agc cgc ctc cac gct gtg ctc 1689
Pro Trp Ile Leu Cys Lys Gly Asp Trp Ser Arg Leu His Ala Val Leu
530 535 540

cct ccc aac aac ggc cga gcc tgc acc gac aac ccc ctg gag gag gag 1737
Pro Pro Asn Asn Gly Arg Ala Cys Thr Asp Asn Pro Leu Glu Glu Glu
545 550 555 560

tac cta gca cag ttg cag gag gcc aag gag tac tagtgacggg gttgctgaac 1790
Tyr Leu Ala Gln Leu Gln Glu Ala Lys Glu Tyr
565 570

agacactgca gggagagggc aggccggctgc tgctgtgca cgggagaact ttccctggtag 1850

ggccctcacc cgccccctgcc cagacagggg gagggaaaggg ctccccccagt gaggttggtc 1910

cgaggctgtg tgccctctgc cagcgacccc gaagcagata tctcagtggg gtttagtgaga 1970

aggttgaagg gtatgttaggg cccagggtgg gtgtccctgg gagccctgga aatgtgcata 2030

6/12

tgtgcatgtg tctgccgggg cctccctctg ctgcctgctg ggaccctggc cactcattt 2090
tctcctcctt gggagctggg ctcttctgcc ctggctctgc acataagtgt tagccagcag 2150
ctccagaaaa atcccgattc ccgggatctg ccacgagtca ctcctactcc accctgatgg 2210
ccagcagagg aagggccact cttctcatgg gcacagccat ctttgccgg gggggcatcc 2270
agccccgggtg gccacccctc cttatctctg ggtggtgcac atgcccctct ttccccactc 2330
cctgccacga gccactgcac aggaggctat ctgtagecccc aagctgcctt tctgttggac 2390
accaacttta gtcttggct gcaagccagc ccagctgagg cgaagtggac tccaggcagg 2450
gaatgggttg cccaattctg gtcccttcc tttgctcagc cccctctgtt ctgctgattt 2510
tagggatgtg cagggctggg agttggcact ccccccagt ggggaggtga cagcttgta 2570
cagtagccag gcttgggtgg gttcagcact agctcggac ggtgtgtcac acgtctata 2630
taaaccagtt ctctggagg ggaaaaaaagc cctgatttt tgcatggg cagttctgt 2690
ggtgtaaatt ctcccagcag tgtcccatgt catgctgcca gcatcactga atgcactgaa 2750
ctcagagttg ggaagagatg cacataatcg ctctccggc acacctcatg cctttccct 2810
gcctcccat tcccctggct gcacttcctt gccttctatg gggttgaaat gttgaagtct 2870
caactgtctc tggtcacaag agccaccaaa agttagggga cttcagtcct agccccaga 2930
tggccgcctt gaagctctt gggctcctca gcaataaagc actttattt c 2981

<210> 2

<211> 571

<212> PRT

<213> Homo sapiens

7/12

<400> 2

Met Arg Ala Leu Arg Asp Arg Ala Gly Leu Leu Leu Cys Val Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Ala Leu Leu Glu Ala Ala Leu Gly Leu Pro Val Lys Lys Pro
20 25 30

Arg Leu Arg Gly Pro Arg Pro Gly Ser Leu Thr Arg Leu Ala Glu Val
35 40 45

Ser Ala Ser Pro Asp Pro Arg Pro Leu Lys Glu Glu Glu Ala Pro
50 55 60

Leu Leu Pro Arg Thr His Leu Gln Ala Glu Pro His Gln His Gly Cys
65 70 75 80

Trp Thr Val Thr Glu Pro Ala Ala Met Thr Pro Gly Asn Thr Thr Pro
85 90 95

Pro Arg Thr Pro Glu Val Thr Pro Leu Arg Leu Glu Leu Gln Lys Leu
100 105 110

Pro Gly Leu Ala Ser Thr Thr Leu Ser Thr Pro Asn Pro Asp Thr Gln
115 120 125

Ala Ser Ala Ser Pro Asp Pro Arg Pro Leu Arg Glu Glu Glu Ala
130 135 140

Arg Leu Leu Pro Arg Thr His Leu Gln Ala Glu Leu His Gln His Gly
145 150 155 160

Cys Trp Thr Val Thr Glu Pro Ala Ala Leu Thr Pro Gly Asn Ala Thr
165 170 175

Pro Pro Arg Thr Gln Glu Val Thr Pro Leu Leu Leu Glu Leu Gln Lys
180 185 190

8/12

Leu Pro Glu Leu Val His Ala Thr Leu Ser Thr Pro Asn Pro Asp Asn

195 200

205

Gln Val Thr Ile Lys Val Val Glu Asp Pro Gln Ala Glu Val Ser Ile

210 215

220

Asp Leu Leu Ala Glu Pro Ser Asn Pro Pro Pro Gln Asp Thr Leu Ser

225 230

235

240

Trp Leu Pro Ala Leu Trp Pro Phe Leu Trp Gly Asp Tyr Lys Gly Glu

245 250

255

Glu Lys Asp Arg Ala Pro Gly Glu Lys Gly Glu Glu Lys Glu Glu Asp

260 265

270

Glu Asp Tyr Pro Ser Glu Asp Ile Glu Gly Glu Asp Gln Glu Asp Lys

275 280

285

Glu Glu Asp Glu Glu Glu Gln Ala Leu Trp Phe Asn Gly Thr Thr Asp

290 295

300

Asn Trp Asp Gln Gly Trp Leu Ala Pro Gly Asp Trp Val Phe Lys Asp

305 310

315

320

Ser Val Ser Tyr Asp Tyr Glu Pro Gln Lys Glu Trp Ser Pro Trp Ser

325 330

335

Pro Cys Ser Gly Asn Cys Ser Thr Gly Lys Gln Gln Arg Thr Arg Pro

340 345

350

Cys Gly Tyr Gly Cys Thr Ala Thr Glu Thr Arg Thr Cys Asp Leu Pro

355 360

365

Ser Cys Pro Gly Thr Glu Asp Lys Asp Thr Leu Gly Leu Pro Ser Glu

370 375

380

9/12

Glu Trp Lys Leu Leu Ala Arg Asn Ala Thr Asp Met His Asp Gln Asp
385 390 395 400

Val Asp Ser Cys Glu Lys Trp Leu Asn Cys Lys Ser Asp Phe Leu Ile
405 410 415

Lys Tyr Leu Ser Gln Met Leu Arg Asp Leu Pro Ser Cys Pro Cys Ala
420 425 430

Tyr Pro Leu Glu Ala Met Asp Ser Pro Val Ser Leu Gln Asp Glu His
435 440 445

Gln Gly Arg Ser Phe Arg Trp Arg Asp Ala Ser Gly Pro Arg Glu Arg
450 455 460

Leu Asp Ile Tyr Gln Pro Thr Ala Arg Phe Cys Leu Arg Ser Met Leu
465 470 475 480

Ser Gly Glu Ser Ser Thr Leu Ala Ala Gln His Cys Cys Tyr Asp Glu
485 490 495

Asp Ser Arg Leu Leu Thr Arg Gly Lys Gly Ala Gly Met Pro Asn Leu
500 505 510

Ile Ser Thr Asp Phe Ser Pro Lys Leu His Phe Lys Phe Asp Thr Thr
515 520 525

Pro Trp Ile Leu Cys Lys Gly Asp Trp Ser Arg Leu His Ala Val Leu
530 535 540

Pro Pro Asn Asn Gly Arg Ala Cys Thr Asp Asn Pro Leu Glu Glu Glu
545 550 555 560

Tyr Leu Ala Gln Leu Gln Glu Ala Lys Glu Tyr
565 570

10/12

<210> 3

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligo-cap Linker

<400> 3

agcaucgagu cggccuuguu ggccuacugg

30

<210> 4

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

gcggctgaag acggcctatg tggcttttt ttttttttt tt

42

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

agcatcgagt cggccttgtt g

21

11/12

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

gcggctgaag acggcctatg t

21

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

gcttctgcct gcgttccatg ctgtctg

27

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

12/12

<400> 8

ggcacacagc ctcggaccaa cctcact

27

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 9

ctccccgtga agaagccgcg gctc

24

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

gcaagcttct agtactcctt ggcctcctgc aa

32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04514

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C12N15/16, C12N15/12, C12N15/85, C12N5/10, C12P21/02, C07K14/575, C07K14/72, C12Q1/68, C12Q1/02, A61K67/027 // (C12P21/02, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12N15/16, C12N15/12, C12N15/85, C12N5/10, C12P21/02, C07K14/575, C07K14/72, C12Q1/68, C12Q1/02, A61K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X/A | Peter S. Nelson et al., "An Expressed-Sequence-Tag Database of Human Prostate: Sequence Analysis of 1168 cDNA Clones", GENOMICS (1998), Vol.47, No.1, p.12-25 | 7/1-6, 8-18 |

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 October, 2000 (02.10.00)Date of mailing of the international search report
10 October, 2000 (10.10.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPOO/04514

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C12N15/16, C12N15/12, C12N15/85, C12N5/10, C12P21/02,
 C07K14/575, C07K14/72, C12Q1/68, C12Q1/02, A61K67/027
 // (C12P21/02, C12R1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C12N15/16, C12N15/12, C12N15/85, C12N5/10, C12P21/02,
 C07K14/575, C07K14/72, C12Q1/68, C12Q1/02, A61K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X/A | Peter S. Nelson et al., "An Expressed-Sequence-Tag Database of Human Prostate: Sequence Analysis of 1168 cDNA Clones", GENOMICS (1998) Vol. 47, No. 1, p. 12-25 | 7/1-6, 8-18 |

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

| | |
|--|--|
| 国際調査を完了した日 02. 10. 00 | 国際調査報告の発送日 10.10.00 |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目 4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員) 本間 夏子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488 4N 9637  |